动物学研究 2003, Apr. 24 (2): 81~85 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

卵裂球电脉冲融合制作昆明小鼠四倍体胚胎

文端成[1,2]，毕春明[1]，朱子玉[1]，雷 蕾[1]，杨彩侠[1]，陈大元[1,3]
（1. 中国科学院动物研究所 计划生育生殖生物学国家重点实验室，北京 100080；
2. 广州医学院 实验动物研究中心，广东 广州 510182）

摘要：为制作四倍体小鼠胚胎，用4种脉冲电压强度（600、800、1 000和1 200 V/cm）和3种脉冲宽度（10、30和50 μs）组合，对2-细胞昆明小鼠胚胎做了融合实验。600 V/cm×50 μs和1 200 V/cm×30 μs两种组合融合率最高，分别为91.6%和93.0%；而600 V/cm×10 μs和1 200 V/cm×50 μs时均显著低于其他各种组合，融合率分别为58.9%和60.2%。以上结果表明，一定的脉冲电压强度是胚胎融合的必要条件，而脉冲宽度是影响胚胎融合及其后期发育的关键因素。激光共聚焦显微镜对融合后两细胞核的观察暗示，细胞核的迁移、靠近和融合是自发过程。

关键词：昆明小鼠；电脉冲参数；四倍体胚胎；融合率；囊胚率
中图分类号：Q813.2；Q492.2 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2003)02-0081-05

Forming Tetraploid Embryos with Electric Fusing Blastomeres of Kunming Mouse Embryos

WEN Duan-cheng[1,2], BI Chun-ming[1], ZHU Zi-yu[1],
LEI Lei[1], YANG Cai-xia[1], CHEN Da-yuan[1]
(1. *State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080, *China*;
2. *Laboratory Animal Research Center, Guangzhou Medical College, Guangzhou* 510182, *China*)

Abstract: To form tetraploid embryos, electric pulses were used to stimulate 2-cell blastomeres of Kunming mice. The pulses included combinations of four strengths (600, 800, 1 000 and 1 200 V/cm) and three durations (10, 30 and 50 μs). Of the combinations, 600 V/cm×50 μs and 1 200 V/cm×30 μs produced the fusion rates of 91.6% and 93.0% respectively, and both were higher than the others. On the other hand, the pulses of 600 V/cm×10 μs and 1 200 V/cm ×50 μs did the rates of 58.9% and 60.2% respectively, being significantly lower than the others. The results showed that a certain pulse strength was necessary to achieve embryo fusion, and the duration was a key factor affecting the embryo fusion and its later development. What observed with a laser confocal microscope implied that the allocation, approach and fusion of nucleus was a spontaneous process in fused embryos.

Key words: Kunming mouse; Electric pulse parameter; Tetraploid embryo; Fusion rate; Blatocyst rate

哺乳动物的四倍体（4n）在自然界中是一种染色体畸型，其自然发生率非常低。小鼠的4n胚胎可以着床，部分可发育到体节期（O'Nell, 1990; Kaufman & Webb, 1990），有些甚至可以发育直到出生，但胎儿一般为畸型（Snow, 1973, 1975, 1976; Kaufman & Webb, 1990）。由于2n/4n嵌合体胚胎在发育过程中，4n来源的细胞主要分布在胚外组织（extraembryonic tissue），如滋养层、卵黄囊膜、尿囊膜和胎盘等，几乎不参与胎儿本身的形成。因此，2n/4n嵌合体胚胎在胚胎发育调控机理的研究、基因缺陷动物模型的建立和动物克隆方面有着特殊的应用价值。在实验室中，制作4n胚胎

收稿日期：2002-09-13；接受日期：2002-12-31
国家基础性研究重大关键项目（攀登-专-08）；中国科学院创新工程重大项目（KSCXl-05-01）
3. 通讯联系人

通常采用三种方法：一是用抑制胞质分裂的药物处理胚胎，使胞质停止分裂，但 DNA 可照常复制，因此使 DNA 的量在一个细胞中加倍，从而形成 4n 胚胎（Snow，1973）；另一种是显微注射，即把一个二倍体（2n）胚胎的细胞核直接注入到受精卵中，这样发育而来的胚胎就是 4n 胚胎（Modlinski，1978）；第三种是卵裂球融合法，化学药物如聚二乙醇（PEG）、仙台病毒和电击等都能使卵裂球融合。其中卵裂球电融合是最简便、高效的一种，已广泛用于小鼠（Kubiak & Tarkowski，1985；Everett & West，1998）、大鼠（Krivokharchenko，2002）、家兔（Ozil & Modlinski，1986）、猪（Prather et al，1996）和牛（Curnow et al，2000；Iwasaki et al，1989；Iwasaki et al，2000）等动物的 4n 胚胎制作。电融合原理是在紧密相联的两个卵裂球的接触面上垂直施加一定强度的电脉冲，电脉冲使细胞膜的通透性瞬时增加，进而造成细胞膜的穿孔，使卵裂球的细胞膜发生融合（Kubiak & Tarkowski，1985；Kaufman & Webb，1990；Nagy et al，1993；James et al，1995）。脉冲的电压强度和宽度直接影响着胚胎的融合效率（Kubiak & Tarkowski，1985），但它们是怎样影响胚胎融合效率的？胚胎融合后的发育率是否也受这些参数的影响？为研究这一问题，我们用昆明小鼠的 2－细胞胚胎进行卵裂球电融合，比较了脉冲参数的不同组合对融合率和 4n 胚胎体外发育率的影响，并用激光共聚焦显微镜观察细胞核的迁移和融合过程。

1 材料和方法

1.1 2－细胞胚胎的获取

20～25 g 的雌性昆明小鼠，每只注射 PMSG 10 IU，48 h 后再注射 hCG 10 IU，与能生育的雄鼠合笼，37～40 h 后将雌鼠脱颈椎处死，将输卵管从子宫和卵巢上分离，置于 M2 培养液中。在体视显微镜下用钝的 4 号注射针头插入输卵管伞口，用尖镊将针头和输卵管伞一起夹住，注入约 0.1 mL 的 M2 溶液冲洗，收集冲出的 2－细胞胚胎，并在 M2 溶液中清洗 2～3 遍后用于电融合。

1.2 2－细胞胚胎的电融合

2－细胞胚胎置于电融合液（0.25 mol/L 山梨醇，0.5 mmol/L 醋酸镁，0.1 mmol/L 醋酸钙，0.5 mmol/L Hepes 和 1 mg/mL BSA）中平衡 2 min，再转入电融合槽中（0.1 cm 宽），用 2001 型电融合仪（BTX inc. San Diego）融合。先用 4 V 的交流电对胚胎进行排队，使胚胎两个卵裂球的接触面与电融合槽的两根金属丝平行。待所有胚胎均排好队，根据实验设计要求调好矩形直流脉冲电压强度（600、800、1 000 和 1 200 V/cm）和宽度（10、30 和 50 μs），连续给予 2 个同样的脉冲进行融合。电融合后，将胚胎转入 M2 溶液中，清洗 2～3 遍，再移入 CZB 溶液中培养 1 h，在体视显微镜下统计融合率（100%×融合数/实验胚胎数，其中融合数为融合后能继续发育的 4n 胚胎数）。将未融合的胚胎移出；融合的胚胎转入 37 ℃ 5% CO_2 中培养，72 h 后检查囊胚率（100%×囊胚数/融合数）。

1.3 细胞核融合动态观察

胚胎电融合后，每隔 1 h 取 6 枚胚胎用 3.7% 多聚甲醛固定 40 min，随后用含 0.3% BSA 的 PBS（pH 7.2）清洗 1～2 遍，胚胎用鬼笔环肽标记微丝，PI 标记细胞核后，在激光共聚焦显微镜（Leica TCS-4D）下观察细胞核的迁移及融合情况。

1.4 染色体观察

将 2n 和 4n 囊胚分别转入到含 0.3 μg/mL 秋水仙素的 CZB 溶液中培养 4～5 h，然后移入 1% 柠檬酸钠溶液低渗中处理 1 h，再用预冷的固定液Ⅰ（甲醇:冰醋酸:水＝9:1:4）固定 2～3 min，然后转移到预冷的载玻片上，用预冷的固定液Ⅱ（甲醇:冰醋酸＝3:1）直接滴在胚胎上，并用吸管轻轻吹打胚胎，使胚胎细胞分散，玻片在室温下干燥过夜后，用 Gimsa 染液染色，在激光共聚焦显微镜或生物显微镜下照相和计数。

1.5 数据统计

融合率和囊胚率经 arcsin 数据转换后，用双因子方差检验组间显著性，并用独立样本 t 测验进行均数的两两比较（$P<0.05$）。

2 结 果

2.1 电脉冲参数对卵裂球融合的影响

脉冲电压强度和宽度对昆明小鼠 2－细胞卵裂球融合的影响见表1。其中，600 V/cm×50 μs 和 1 200 V/cm×30 μs 两种组合融合效果最好，融合率均在 90% 以上。而 600 V/cm×10 μs 和 1 200 V/cm×50 μs 两种组合的融合率均显著低于其他各种组合，只有约 60%；前者有近 40% 的胚胎不能融合，后者有 28.4% 的单卵裂球或双卵裂球解体死亡。其余组合的融合率在 78%～88%。4 种电压强度组

间的融合率无差异（$F_{3,44}=0.255$，$P=0.858$），而 3 种宽度组间有显著差异（$F_{2,45}=3.578$，$P=0.036$）。

2.2 电脉冲参数对 4n 胚胎体外发育的影响

脉冲电压强度和宽度对 4n 胚胎囊胚率的影响见表 2。1 200 V/cm × 50 μs 组合所得 4n 胚胎的囊胚率仅为 55.5%，显著低于其他各组合（除 800 V/cm × 50 μs 组合外）。600、800、1 000 V/cm × 50 μs 各组合的囊胚率在 64% ~ 74%，各组合间无差异。4 种电压强度与 10、30 μs 宽度组合的囊胚率都在 80% 以上（除 1 200 V/cm × 30 μs 组合为 72.8%），各组合间无差异，但显著高于 50 μs 组。4 种电压强度组间的 4n 胚胎的囊胚率无差异（$F_{3,44}=2.361$，$P=0.084$），而 3 种宽度组间存在显著差异（$F_{2,45}=23.892$，$P=0$）。

2.3 细胞核融合的观察

电融合 30 min 后，在大部分胚胎中仍可见 2 个卵裂球的融合痕迹：在膜融合界面，有较多的微丝聚集；3 h 后，2 个细胞核相互接近，细胞核开始融合；5 ~ 6 h 后，融合完成；20 h 后，大部分融合后的胚胎可完成第一次分裂，4n 胚胎在 4 细胞期开始致密化，第三天可到达囊胚期，与正常 2n 胚胎到达囊胚期的时间一致。

4n 小鼠囊胚在形态上与正常 2n 小鼠囊胚没有区别，但囊胚的细胞数量明显少于 2n 囊胚的数量。4n 囊胚细胞的染色体数目有 80 条，为正常 2n 小鼠囊胚细胞的 2 倍（图 1）。

3 讨　论

3.1 脉冲参数与融合率的关系

影响卵裂球融合的因素有许多，如融合液的类型（Kubiak & Tarkowski，1985），胚胎的种类、卵裂球的体积和电脉冲参数等（Kubiak & Tarkowski，1985；Ozil & Modlinski，1986；Iwasaki et al，1989）。在电脉冲参数中，以脉冲的电压强度和脉冲宽度对融合率的影响最为直接。细胞膜能否被电击穿并发生膜融合，主要取决于脉冲的电压强度和宽度（Zimmermann & Vienken，1982）。Ozil & Mod-

表 1　不同电脉冲参数作用下昆明小鼠 2 – 细胞卵裂球的融合率（实验胚胎数，融合后胚胎死亡率）*

Table 1　Fusion rate of 2-cell blastomeres fused by electric pulses with different parameters in Kunming mice (no. of experimented embryos, death rate of embryos after fusion)*

脉冲宽度 Pulse duration (μs)	脉冲电压强度 Pulse strength (V/cm)			
	600	800	1 000	1 200
10	58.9 ± 11.6[e] (135, 0)	81.3 ± 7.5[bc] (117, 0)	85.3 ± 5.1[bcd] (150, 0)	88.0 ± 6.9[ab] (112, 3)
30	87.1 ± 6.6[ab] (167, 0)	85.5 ± 7.8[ab] (174, 0)	87.7 ± 5.1[ab] (136, 0)	93.0 ± 4.2[a] (141, 3.8)
50	91.6 ± 4.9[ad] (119, 0)	88.1 ± 6.2[ab] (100, 5.6)	78.5 ± 6.6[c] (246, 12.2)	60.2 ± 4.7[e] (120, 28.4)

* 融合率上标字母不同者存在显著差异（$P<0.05$）。

* Fusion rates with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

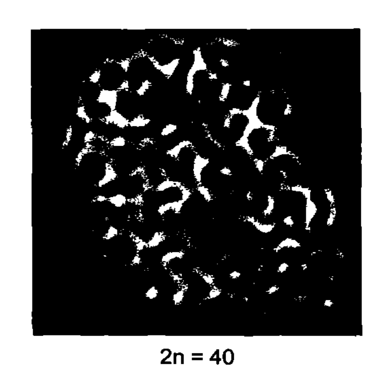
表 2　不同电脉冲参数作用下昆明小鼠 2 – 细胞卵裂球融合后的囊胚率（融合胚胎数）*

Table 2　Blatocyst rates of 2-cell blastomeres fused by electric pulses with different parameters in Kunming mice (no. of fused embryos)*

脉冲宽度 Pulse duration (μs)	脉冲电压强度 Pulse strength (V/cm)			
	600	800	1 000	1 200
10	84.1 ± 5.3[a] (78)	80.2 ± 8.3[a] (94)	81.3 ± 2.2[a] (110)	81.4 ± 3.7[a] (98)
30	84.0 ± 4.0[a] (120)	81.6 ± 10.8[ab] (107)	81.1 ± 4.1[a] (111)	72.8 ± 6.1[b] (130)
50	73.9 ± 5.8[bc] (109)	65.0 ± 9.7[bcd] (88)	64.6 ± 2.6[c] (190)	55.5 ± 5.5[d] (71)

* 囊胚率上标字母不同者存在显著差异（$P<0.05$）。

* Blatocyst rates with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).


2n = 40

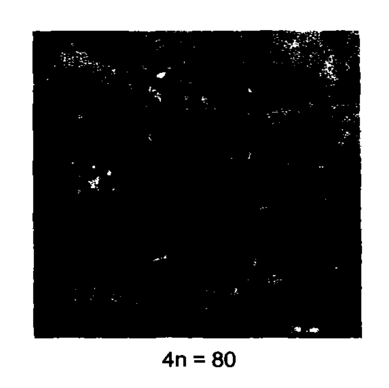

4n = 80

图 1 昆明小鼠二倍体和四倍体胚胎的核型
Fig.1 Karyotypes of diploid and tetraploid cells in Kunming mouse embryos

linski (1986) 分别用 2 500 V/cm 和 3 000 V/cm 的脉冲电压强度融合兔的 2-细胞胚胎，在 35 μs 的脉冲宽度处获得了最高的融合率（分别为 89.6% 和 85.0%），而进一步将脉冲宽度增加到 100 μs、500 μs 和 1 000 μs 后，融合率不但没有提高，反而有所下降。在本实验中，脉冲电压强度和脉冲宽度这两个参数对 2-细胞小鼠胚胎融合效率的影响是不一样的：当脉冲电压强度在 600 V/cm 到 1 200 V/cm 这一范围内，电压强度对融合率的影响不显著；而脉冲宽度的变化（从 10 μs 到 50 μs）则显著影响融合率。这种影响表现为：①脉冲电压强度较低时（600～800 V/cm），脉冲宽度的增加可以显著提高融合率；②脉冲电压强度较高时（1 000～1 200 V/cm），随着脉冲宽度的增加，融合后胚胎死亡率也增加，即有效融合率下降。这一结果与 Ozil & Modlinski (1986) 在兔胚胎上得到的结果相似。

事实上，脉冲电压强度与细胞的融合效率也有一定的联系，Kubiak & Tarkowski (1985) 用 600、800 和 1 000 V/cm 的电压强度，50 μs 的脉冲宽度，以 PBS 溶液作为融合液对小鼠 2-细胞胚胎进行融合：在 600 V/cm 和 50 μs 的融合条件下，35 枚胚胎无一融合；800 V/cm 时，有 35% 融合；1 000 V/cm 时，有 67% 融合。我们用山梨醇作为融合液时，融合电压低于 300 V/cm 时，尽管脉冲宽度增加，2-细胞小鼠胚胎的融合率仍非常低，融合率不超过 30%（未发表数据）。这些数据表明，在进行胚胎卵裂球的电融合时，可能存在一个脉冲电压强度的最低阈值，电压强度低于阈值时，卵裂球不会发生融合，只有当电压强度达到或超过某一阈值时，细胞融合才能发生。而且，在不同的电融合液中，这一阈值也可能不同。

在本实验中，使用低电压 × 宽脉冲（600 V/cm × 50 μs）组合和高电压 × 中宽脉冲（1 200 V/cm × 30 μs）组合，获得了最好的融合效果；而使用低电压 × 窄脉冲（600 V/cm × 10 μs）组合和高电压 × 宽脉冲（1 200 V/cm × 50 μs）组合，融合率最低。这些结果说明，脉冲电压强度和脉冲宽度这两个参数是影响胚胎融合效果的最直接因素，脉冲电压强度的增大，脉冲宽度的增加，一方面可以提高对细胞膜的击穿能力，提高胚胎的融合效率；另一方面由于强度增大，宽度增加而导致胚胎裂解死亡，从而使胚胎的融合效率降低。因此，电脉冲对胚胎的融合可能存在一个最适宜的强度和宽度范围。在本实验系统中，600 V/cm × 50 μs 和 1 200 V/cm 和 30 μs 这两种组合可能是对昆明小鼠 2-细胞胚胎的较适宜的融合参数。

3.2 脉冲参数对胚胎融合后发育率的影响

电融合时的脉冲参数可以影响到 4n 胚胎的发育能力（Iwasaki et al, 1989; Ozil & Modlinski, 1986）。在本实验中，不同脉冲电压强度之间的囊胚率无差异，而不同脉冲宽度之间的囊胚率有显著差异（$P < 0.05$）。脉冲宽度为 10 和 30 μs 时，各个组合之间的囊胚率无差异；而脉冲宽度为 50 μs 时，囊胚率都显著低于 10 和 30 μs 组的囊胚率。结果提示：脉冲电压强度在 600 到 1 200 V/cm 这一范围内，电压强度的变化不影响 4n 胚胎的发育能力；但脉冲宽度对 4n 胚胎的发育能力有显著影响，脉冲宽度为 50 μs 时，4n 胚胎的发育能力显著降低。

2-细胞胚胎卵裂球在电融合后，两个细胞核可自发地相互靠近，并完成核的融合。两细胞核的

迁移和靠近可能是由微丝而非微管控制的。当用细胞松驰素 B（特异解聚微丝的药物）处理电融合后的胚胎时，两细胞核不能迁移和靠近。而用秋水仙碱（特异抑制微管形成的药物）处理电融合后的胚胎时，两个细胞核可以迁移、靠近，并发生融合，但不能再进一步分裂。荧光染色观察发现，卵裂球融合后不能进一步分裂的胚胎的两个细胞核不能靠近，而且核物质呈弥散状态（未发表资料）。这些结果提示：细胞核的迁移、靠近并发生融合是自发进行的，细胞核的完整性可能是细胞核迁移、靠近和融合的一个基本条件。较长的脉冲宽度一方面可能更容易引起细胞膜破裂，使胚胎死亡；另一方面也可能会破坏细胞核的完整性，使细胞核不能完成迁移、靠近和融合过程，胚胎也就不能进一步发育。

总之，脉冲参数对胚胎的融合率和发育能力的影响是明显的。一定的脉冲电压强度是胚胎融合的必要条件，而脉冲宽度是影响胚胎融合及其后期发育的关键因素。在一定的脉冲电压强度范围内，脉冲宽度的增加，可以降低胚胎的发育能力。因此，在选择脉冲参数时，在保证融合率的情况下，应尽可能使用窄脉冲。

参考文献：

Curnow EC, Gunn IM, Trounson AO. 2000. Electrofusion of two-cell bovine embryos for the production of tetraploid blastocysts *in vitro* [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, **56**: 372-377.

Everett CA, West JD. 1998. Evidence for selection against tetraploid cells in tetrapoid↔diploid mouse chimaeras before the late blastocyst stage [J]. *Genet. Res.*, **72**: 225-228.

Iwasaki S, Kono T, Fukatsu H, Nakahara T. 1989. Production of bovine tetraploid embryos by electrofusion and their developmental capability *in vitro* [J]. *Gamete Res.*, **24**: 261-267.

Iwasaki S, Campbell KHS, Galli C, Akiyama K. 2000. Production of live calves derived from embryonic stem-like cells aggregated with tetraploid embryos [J]. *Biol. Reprod.*, **62**: 470-475.

James RM, Klerkx AHEM, Keighren M, Flockhart JH, West JD. 1995. Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid ↔diploid chimaeras [J]. *Dev. Biol.*, **167**: 213-226.

Kaufman MH, Webb S. 1990. Postimplantation development of tetraploid mouse embryos produced by electrofusion [J]. *Development*, **110**: 1121-1132.

Krivokharchenko A, Galat V, Ganten D, Bader M. 2002. *In vitro* formation of tetraploid rat blastocysts after fusion of two-cell embryos [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, **61**: 460-465.

Kubiak JZ, Tarkowski AK. 1985. Electrofusion of mouse blastomeres [J]. *Exp. Cell Res.*, **157**: 561-566.

Modlinski JA. 1978. Transfer of embryonic nuclei to fertilised mouse eggs and development of tetraploid blastocysts [J]. *Nature*, **273** (8): 466-467.

Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**: 8424-8428.

O'Nell GT, Speirs S, Kaufman MH. 1990. Sex chromosome constitution of postimplantation tetraploid mouse embryos [J]. *Cytogenetics Cell Genetics*, **53**: 191-195.

Ozil JP, Modlinski JA. 1986. Effects of electric field on fusion rate and survival or two-cell rabbit embryos [J]. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **96**: 211-228.

Prather RS, Hoffman KE, Schoenbeck RA, Stumpf TT, Li J. 1996. Characterization of DNA synthesis during the two-cell stage and the production of tetraploid chimeric pig embryos [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, **45**: 38-42.

Snow MHL. 1973. Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage [J]. *Nature*, **244**: 513-515.

Snow MHL. 1975. Embryonic development of tetraploid mice during the second half of gestation [J]. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **34**: 707-721.

Snow MHL. 1976. The immediate postimplantation development of tetraploid mouse blastocysts [J]. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **35**: 81-86.

Zimmermann U, Vienken J. 1982. Electric field-induced cell-to-cell fusion [J]. *J. Membrane Biol.*, **67**: 165-182.